

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-293081

(43)Date of publication of application : 23.10.2001

(51)Int.Cl.

A61L 27/00  
C12N 5/06  
//(C12N 5/06  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 2001-030154

(71)Applicant : OCHI MITSUO  
JAPAN TISSUE ENGINEERING:KK

(22)Date of filing : 06.02.2001

(72)Inventor : OCHI MITSUO  
UCHIO YUJI  
KAWASAKI KENZO  
KATSUBE KENICHI  
KATO MASAKAZU  
YAMAMOTO TAKAYUKI  
FUKUSHIMA RIKI

(30)Priority

Priority number : 2000029256 Priority date : 07.02.2000 Priority country : JP

(54) MATERIAL FOR IMPLANTING CARTILAGE AND METHOD OF MANUFACTURING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a material for implanting cartilaginous cells having a high affinity to a living body and can reproduce a cartilaginous tissue efficiently after implanting.

SOLUTION: A cartilaginous cell is sowed by sowing density for producing mesenchondrium in preference to proliferation of cartilage cells, preferably,  $2 \times 10^5$  pcs./ml to  $2 \times 10^7$  pcs./ml, is embedded and cultured in a collagen gel and then the mesenchondrium such as chondroitin sulfate is kept in the collagen gel.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-293081

(P2001-293081A)

(43) 公開日 平成13年10月23日 (2001. 10. 23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	G
C 1 2 N 5/06		C 1 2 R 1:91)	
// (C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2001-30154(P2001-30154)	(71) 出願人	599170434 越智 光夫 広島県広島市安佐南区山本2-11-3
(22) 出願日	平成13年2月6日 (2001. 2. 6)	(71) 出願人	399051858 株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジ ニアリング 愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1
(31) 優先権主張番号	特願2000-29256(P2000-29256)	(72) 発明者	越智 光夫 広島県広島市安佐南区山本2-11-3
(32) 優先日	平成12年2月7日 (2000. 2. 7)	(72) 発明者	内尾 祐司 島根県出雲市塩冶有原1-35 10-105号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100057874 弁理士 曾我 道照 (外8名)
特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年8月25日 社団法人日本整形外科学会発行の「日本整形外科学会雑 誌第73巻第8号」に発表		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 軟骨移植用材料及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 生体との親和性が高く移植後に軟骨組織を効率よく再建可能な軟骨細胞移植材料及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 軟骨細胞を、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う播種密度、好ましくは $2 \times 10^5$ 個/ml $\sim 2 \times 10^7$ 個/mlで軟骨細胞を播種してコラーゲンゲル中で包埋培養して、コラーゲンゲル中に、コンドロイチン硫酸などの軟骨基質を保持させた軟骨移植用材料及びその製造方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コラーゲンゲルを基材とする軟骨移植用材料であって、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う播種密度で軟骨細胞を播種してコラーゲンゲル中で包埋培養し、前記軟骨基質が前記コラーゲンゲル中に保持されたことを特徴とする軟骨移植用材料。

【請求項2】 前記軟骨細胞の播種密度が、 $2 \times 10^5$  個/ml  $\sim 2 \times 10^7$  個/mlであることを特徴とする請求項1記載の軟骨移植用材料。

【請求項3】 前記コラーゲンゲルの濃度が0.1重量%以上5重量%未満であることを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の軟骨移植用材料。

【請求項4】 前記コラーゲンゲルがコラーゲン末端のテロペプチドを切断したアテロコラーゲンであり、該アテロコラーゲンの濃度が0.6重量%以上3重量%未満であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の軟骨移植用材料。

【請求項5】 前記包埋培養後のコラーゲンゲルに存在する線維芽様細胞の数が、軟骨細胞の数よりも少ないことを特徴とする請求項1乃至請求項4のいずれかに記載の軟骨移植用材料。

【請求項6】 前記コラーゲンがニワトリ、ブタ由来であることを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の軟骨移植用材料。

【請求項7】 コラーゲンゲルを基材とする軟骨移植用材料の製造方法であって、軟骨細胞を、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う播種密度で播種して前記コラーゲンゲル中で包埋培養し、前記軟骨細胞の軟骨基質を前記コラーゲンゲル中に保持させることを特徴とする軟骨移植用材料の製造方法。

【請求項8】 前記軟骨細胞の播種密度が、 $2 \times 10^5$  個/ml  $\sim 2 \times 10^7$  個/mlであることを特徴とする請求項7記載の軟骨移植用材料の製造方法。

【請求項9】 前記コラーゲンゲルの濃度が0.1重量%以上5重量%未満であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の軟骨移植用材料の製造方法。

【請求項10】 前記コラーゲンゲルがコラーゲン末端のテロペプチドを切断したアテロコラーゲンであり、該アテロコラーゲンの濃度が0.6重量%以上3重量%未満である請求項7乃至請求項9のいずれかに記載の軟骨移植用材料の製造方法。

【請求項11】 前記包埋培養後のコラーゲンゲルに存在する線維芽様細胞の数が、軟骨細胞の数よりも少ないことを特徴とする請求項7乃至請求項10のいずれかに記載の軟骨移植用材料の製造方法。

【請求項12】 前記コラーゲンがニワトリ、ブタ由来であることを特徴とする請求項7乃至請求項11のいずれかに記載の軟骨移植用材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、軟骨移植用材料及びその製造方法に関し、特にコラーゲンゲルを基材とする軟骨移植用材料及びその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、自然修復不可能な関節軟骨損傷に対して、移植という手段が取られている。

【0003】近年、このような関節軟骨損傷に対して、培養軟骨細胞を浮遊液の状態で移植する方法が開発され (Brittbergら; New Eng. J. Med. 331 (1994) 889-895)、欧米では臨床応用されている。この方法で用いられる培養軟骨細胞は、軟骨欠損患者の非荷重部関節軟骨組織からごく少量の軟骨細胞を採取し、in vitroで培養して増殖させたものである。しかし、この方法では移植細胞の漏出という問題があり、さらに、培養時に軟骨細胞が培養液に接するために、軟骨細胞が産生した軟骨基質が培養液中に流出する問題もある。また、長期間の単層培養では本来の形質を失うとされる軟骨細胞が、移植後、硝子軟骨細胞としての機能を発現できるのかという問題が指摘されていた。

【0004】一方、軟骨細胞と生体材料を組み合わせた組織工学的手法を用いた軟骨欠損の修復法が報告されている。

【0005】このような方法には、生体吸収性高分子であるポリ乳酸やポリグリコール酸などを足場として、これに軟骨細胞を播種する方法がある (Vacantiら; Plast. Reconstr. Surg. 88 (1991) 753-)。しかし、この方法には、生体内でポリ乳酸やポリグリコール酸が分解されて生じる低分子が酸性であり毒性があること、また、細胞の足場としての能力にかけるといった問題点が指摘されている。

【0006】また、コラーゲンスポンジを足場として、これに軟骨細胞を播種することにより軟骨組織の再建に成功している報告例もある (浅敷ら; Biomaterial 17 (1996) 155-162)。この場合、細胞の足場としての能力に優れているが、基材自体が多孔質であるため、軟骨細胞がコラーゲンスポンジから漏出した、軟骨基質を保持することができないという欠点が指摘されている。

【0007】これらの技術に対して、本発明者である越智ら (島根医科大) の開発したコラーゲンゲル内培養自家軟骨細胞移植術が報告された (日本醫事新報 No. 3875 (1998) 33-36)。この方法では、軟骨細胞がコラーゲンゲル内で培養されるため、軟骨基質がコラーゲン内に保持され漏出を防止するという利点を有する。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上記の移植術では、液体培地とは異なるゲル状のコラーゲン内で軟骨細胞を培養するため、コラーゲンゲル内での増殖速度の調整が困難である。また、コラーゲンゲル内に保持される軟骨基質量は生体組織と比較すると少なく、治癒効果

の促進やより生体組織に近い移植材料を得るためにも、効率の良い基質生産を行う培養条件が求められていた。

【0009】従って、本発明の目的は、生体との親和性が高く移植後に軟骨組織を効率よく再建可能な軟骨細胞移植材料及びその製造方法を提供することを技術課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】請求項1に記載の軟骨移植用材料は、コラーゲンを基材とする軟骨移植用材料であって、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う播種密度で軟骨細胞を播種してコラーゲンゲル中で包埋培養し、前記軟骨基質が前記コラーゲンゲル中に保持されたことを特徴としている。

【0011】請求項2に記載の軟骨移植用材料は、請求項1において、前記軟骨細胞の播種密度が、 $2 \times 10^5$ 個/ml $\sim 2 \times 10^7$ 個/mlであることを特徴としている。

【0012】請求項3に記載の軟骨移植用材料は、請求項1又は請求項2において、前記コラーゲンゲルの濃度が0.1重量%以上5重量%未満であることを特徴としている。請求項4に記載の軟骨移植用材料は、請求項1乃至請求項3のいずれかにおいて、前記コラーゲンゲルがコラーゲン末端のテロペプチドを切断したアテロコラーゲンであり、該アテロコラーゲンの濃度が0.6重量%以上3重量%未満であることを特徴としている。

【0013】請求項5に記載の軟骨移植用材料は、請求項1乃至請求項4のいずれかにおいて、前記包埋培養後のコラーゲンゲルに存在する線維芽様細胞の数が、軟骨細胞の数より少ないことを特徴としている。

【0014】請求項6に記載の軟骨移植用材料は、請求項1乃至請求項5のいずれかにおいて、前記コラーゲンはニワトリ、ブタ由来であることを特徴としている。

【0015】請求項7に記載の軟骨移植用材料の製造方法は、コラーゲンを基材とする軟骨移植用材料の製造方法であって、軟骨細胞を、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う播種密度で播種して前記コラーゲンゲル中で包埋培養し、前記軟骨細胞の軟骨基質を前記コラーゲンゲル中に保持させることを特徴としている。

【0016】請求項8に記載の軟骨移植用材料の製造方法は、請求項7において、前記軟骨細胞の播種密度が、 $2 \times 10^5$ 個/ml $\sim 2 \times 10^7$ 個/mlであることを特徴としている。

【0017】請求項9に記載の軟骨移植用材料の製造方法は、請求項7又は請求項8において、前記コラーゲンゲルの濃度が0.1重量%以上5重量%未満であることを特徴としている。請求項10に記載の軟骨移植用材料の製造方法は、請求項7乃至請求項9のいずれかにおいて、前記コラーゲンゲルがコラーゲン末端のテロペプチドを切断したアテロコラーゲンであり、該アテロコラー

ゲンの濃度が0.6重量%以上3重量%未満であることを特徴としている。

【0018】請求項11に記載の軟骨移植用材料の製造方法は、請求項7乃至請求項10のいずれかにおいて、前記包埋培養後のコラーゲンゲルに存在する線維芽様細胞の数が、軟骨細胞の数より少ないことを特徴としている。

【0019】請求項12に記載の軟骨移植用材料の製造方法は、請求項7乃至請求項11のいずれかにおいて、前記コラーゲンはニワトリ、ブタ由来であることを特徴としている。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明者らは、上記諸目的を解決するために鋭意検討努力した結果、コラーゲンゲル内での包埋培養の際の播種密度を所定密度に調節することによって、諸目的を達成することを見出した。

【0021】即ち、細胞播種密度によってコラーゲンゲル内での包埋培養時の細胞増殖速度が異なり、低密度で播種した場合、細胞増殖の速度が速く、包埋培養中では軟骨基質の産生よりも細胞の増殖が優先的に行われるが、高密度に播種した場合には細胞増殖速度が遅く、包埋培養中では軟骨基質の産生の方が細胞の増殖よりも優先的に行われる。

【0022】このため、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先的に行う細胞播種密度で軟骨細胞を播種することによって、包埋培養開始当初から軟骨基質の産生を優先的に行わせることができる。これにより、軟骨移植用材料として、生体での軟骨基質濃度に近くて生体との親和性が高い使用可能な状態に早くすることができる。この結果、移植後に軟骨組織を効率よく再建可能な軟骨移植用材料を効率よく短時間で調製して提供できる。

【0023】本発明で用いられるコラーゲンは、軟骨細胞の増殖の足場として人体に安全なものであれば、いずれのものをを用いることができる。このようなコラーゲンには、例えば、日本などBME(ウシ海綿状脳症)の発生していない国由来のウシなどの皮膚から得られるI型コラーゲンや、ブタ、ニワトリ由来のコラーゲンが挙げられる。

【0024】さらに安全性を確保するために、例えばBME(ウシ海綿状脳症)と無関係のブタ、ニワトリ由来のコラーゲンを使用することが好ましく、アレルギー反応を低減化するため、コラーゲン末端のテロペプチドを切断したアテロコラーゲンを使用することがさらに好ましい。これらのコラーゲンは、どれも高純度の製品が入手可能である。

【0025】コラーゲン溶液の調製濃度は、使用目的により0.1 $\sim$ 5.0重量%の幅で調製可能である。0.1重量%よりも低いと、軟骨細胞がコラーゲン中で増殖する際の足場としての機能が十分でないだけでなく細胞の増殖速度が速くなるため細胞の形態変化が起こり易く、5.0重

量%よりも高いと、細胞や軟骨基質がゲル内で均一化するにはゲルの粘性が高すぎるため、好ましくない。コラーゲン溶液の溶媒には、軟骨細胞の培養に不活性な溶媒から選択される。より好ましくは、軟骨細胞の増殖及び形態維持の観点からコラーゲン溶液に抗原性の少ないアテロコラーゲン溶液を使用し、その濃度を0.6重量%～3重量%とすることがよい。

【0026】コラーゲン溶液は、軟骨細胞を含有させた培養液とコラーゲンを混合して調製される。ここで用いられる培養液は、軟骨細胞の通常の培養に用いられる液体培地がそのまま適用可能であり、例えば血清含有ダルベッコ最小必須培地(DMEM)が挙げられる。

【0027】このコラーゲン溶液は、所定の濃度のコラーゲンが溶解されてゲル状となることから、產生された軟骨基質をこのゲル内にほとんど貯蔵することができる。この軟骨基質は、もともと生体中の軟骨組織に保持されて軟骨組織を誘導する基となる物質であるため、移植材料にこのような軟骨基質が保持されていることは、移植後の良好な軟骨再建の観点から必要なことである。多孔質のポリマーやコラーゲンスポンジのように、培養液と細胞が接している培養形態では、本発明のコラーゲンゲルのように基材中に軟骨基質を保持することができないので、本発明のような効果は期待できない。

【0028】コラーゲン溶液中で培養される軟骨細胞には、硝子軟骨、線維性軟骨、弾性軟骨から得たものを使用する。好ましくは、移植後の修復を理想的に行うためには、非荷重部の軟骨から採取された関節軟骨細胞を用いることである。細胞は、組織から採取された後、常法に従って結合組織などを除去して調製される。また、軟骨細胞には、常法を用いた一次培養によって、予め増殖させた細胞を用いてもよい。

【0029】本発明において、コラーゲン溶液中で培養するための細胞の播種密度は、細胞の増殖よりも軟骨基質の產生を優先的に行う播種密度である。このような細胞播種密度にすることによって、包埋培養の開始時から軟骨細胞は軟骨基質の產生を旺盛に行うので、移植材料として必要な量の軟骨基質を効率よく得ることができる。

【0030】これに対して細胞増殖が優先的に行われる低密度の播種条件の場合、播種された細胞は分裂を繰り返すことにより線維芽様細胞へと形態変化しやすい。この点、本発明では、上記播種密度で軟骨細胞を播種して包埋培養を開始するので、増殖を繰り返すことによる細胞の形態の変化を防止することができ、軟骨基質を產生することができない線維芽様細胞が軟骨細胞移植材料中に高い割合で混在することを防止することができる。このため、軟骨細胞による軟骨組織の再建をより効率よく行うことができる。

【0031】ここで、細胞の増殖よりも軟骨基質の產生を優先的に行う播種密度で播種された軟骨移植用材料

は、軟骨細胞の包埋培養後のコラーゲンゲルにおいて、軟骨細胞の線維芽様細胞への形態変化の割合が少ないことにより特定することができる。移植適合性及び軟骨基質の產生の観点から、軟骨細胞の包埋培養後でのコラーゲンゲル内における線維芽様細胞の細胞数は、軟骨細胞の細胞数より少ないこと、すなわち線維芽様細胞の細胞数が、全体の細胞数(線維芽様細胞+軟骨細胞)の略50%未満であることが好ましく、略30%未満であることがより好ましく、略10%未満であることが更に好ましい。

【0032】この場合、コラーゲンゲル中に存在する線維芽様細胞は星状又は紡錘状の細胞であり、これに対して形態を維持した軟骨細胞は円形であるので、両者を顕微鏡下又は裸眼で明確に区別することができる。

【0033】本発明において軟骨細胞の播種密度は、細胞の形態を維持して軟骨基質の產生をより効率よく行わせる観点から、 $2 \times 10^5$ 個/ml～ $2 \times 10^7$ 個/mlの範囲、好ましくは、 $2 \times 10^6$ 個/ml～ $2 \times 10^7$ 個/mlの範囲、より好ましくは、 $4 \times 10^6$ 個/ml～ $2 \times 10^7$ 個/mlの範囲にすることができる。

【0034】この範囲よりも細胞播種密度が低いと、軟骨細胞の増殖の方が軟骨基質の產生よりも優先的に行われ、細胞の形態が変化したり、効率よく十分な量の軟骨基質を產生することができず、好ましくない。また、この範囲よりも細胞播種密度が高いと、軟骨細胞の細胞活性が十分に維持できず、軟骨基質の產生も不十分となるので、好ましくない。

【0035】軟骨細胞は、上記のような細胞浮遊コラーゲン溶液として適当な培養器に播種される。培養器中では、コラーゲン溶液は軟骨細胞の培養に適した上記の濃度に調製されている。得られたコラーゲンゲルでは、軟骨細胞は、ゲルの下層に沈むことがなく、ほぼ均一に分散され、この包埋状態で細胞の培養が行われる。培養を継続することにより軟骨細胞から產生された軟骨基質は、コラーゲンゲル中にほぼ均一に蓄積される。

【0036】細胞の形態維持及び増殖速度並びに軟骨基質產生能の観点から、0.6重量%以上1.6重量%未満のアテロコラーゲン濃度の場合には $2 \times 10^6$ ～ $2 \times 10^7$ の播種密度であることがより好ましく、一方、1.6重量%以上3重量%未満のアテロコラーゲン濃度の場合には $2 \times 10^5$ ～ $2 \times 10^7$ の播種密度であることがより好ましい。

【0037】本発明における軟骨基質は、通常の軟骨細胞が生体内又は培養条件下で產生する物質及び培養条件下で產生される物質のいずれかである。このような物質には、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンやプロテオグリカン、タイプIIコラーゲンなどが挙げられる。軟骨基質の量は、例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などを用いて常法により測定することができる。

【0038】このように、本発明による軟骨移植用材料は、移植時に多くの軟骨細胞と豊富な軟骨基質を含有しているため、生体との親和性も非常に高く、効率よく軟骨の修復を行うことができる。

【0039】本発明の軟骨移植用材料を使用することができる適応症としては、軟骨損傷、離断性軟骨炎、変形性関節症、関節リュウマチなどが挙げられるが、その範囲に限定されるものではなく、軟骨欠損に起因する疾患全般に適用可能である。

【0040】

【実施例】以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0041】(1) ウサギ関節軟骨のコラーゲングル内培養

<実施例1> 日本白色家兎の膝、股、肩関節から関節軟骨を採取し、0.25%トリプシンおよび0.25%コラゲナーゼ

で酵素処理を行い軟骨細胞を分離した。分離した軟骨細胞を培養液と混合して軟骨細胞浮遊液を作製し、この軟骨細胞浮遊液を同量のコラーゲン（アテロコラーゲン：高研社製）内に $2 \times 10^5$ 個/ml、 $4 \times 10^5$ 個/ml、 $2 \times 10^6$ 個/ml、 $4 \times 10^6$ 個/ml、 $2 \times 10^7$ 個/ml、 $4 \times 10^7$ 個/mlの各密度になるように包埋した後、培養を開始した。このとき、コラーゲン溶液の最終濃度は1.5重量%である。培養は、37℃で4週間行い、1週間毎に細胞数の推移、組織学的変化を観察し、コラーゲングル内のコンドロイチン硫酸産生量を定量した。なお、細胞の形態はトルイジンブルーによる染色によって確認した。また、コンドロイチン硫酸の異性体の比（コンドロイチン6硫酸/コンドロイチン4硫酸）を、HPLCによって得られるそれぞれの量から産出した。細胞数の増減と細胞形態の変化の結果を表1に示す。

【0042】

【表1】

播種密度	細胞の増減	細胞形態
$2 \times 10^5$ 個/ml	3週まで増加、約6倍	線維芽様細胞に変化
$4 \times 10^5$ 個/ml	約18日まで、約5倍	60%程度、線維芽様細胞
$2 \times 10^6$ 個/ml	2週まで増加、約2倍	殆ど軟骨細胞形態を維持
$4 \times 10^6$ 個/ml	ほとんど増加しない	軟骨細胞形態
$2 \times 10^7$ 個/ml	ほとんど増加しない	軟骨細胞形態
$4 \times 10^7$ 個/ml	急激に減少傾向	

【0043】表1に示されるように、 $2 \times 10^6$ 個/mlの場合、 $4 \times 10^6$ 個/mlの場合及び $2 \times 10^7$ 個/mlの場合には、増殖の速度は遅く細胞数の大幅な増加は認められなかったが、多くの細胞で、円形である軟骨細胞の形態が維持されており、線維芽様細胞の細胞形態に変化しなかった。全体の細胞数に対して線維芽様細胞は、 $2 \times 10^6$ 個/mlの場合、 $4 \times 10^6$ 個/mlの場合及び $2 \times 10^7$ 個/mlの場合において、ほとんど認められなかった。

【0044】これに対して、 $2 \times 10^5$ 個/mlで播種した場合及び $4 \times 10^5$ 個/mlで播種した場合には、細胞は比較的活発に増殖し、細胞数は共に相対的に大幅に増えたが、殆どの細胞において線維芽様細胞に形態が変化する傾向が見られた（全体の細胞の略90%及び略60%）。また、 $4 \times 10^7$ 個/mlで播種した場合には、細胞数の大幅な減少が認められた。

【0045】一方、4週間後のコンドロイチン硫酸産生含有量は、 $2 \times 10^5$ 個/ml～ $2 \times 10^7$ 個/mlの範囲の細胞播種濃度の場合では、播種細胞濃度に依存してコンドロイチン硫酸の量は多く認められ、軟骨移植用材料として適した量であった。特に、 $4 \times 10^6$ 個/ml～ $2 \times 10^7$ 個/mlにおいては産生量が多く好適であった。また、 $2 \times 10^5$ 個/ml～ $2 \times 10^7$ 個/ml範囲内では、異性体の比も、コンドロイチン硫酸の量と同様に播種細胞濃度に依存して培養の進行と共に増加した。

【0046】これに対して、 $4 \times 10^7$ 個/mlの播種濃度の場合には、コンドロイチン硫酸の産生は認められたものの $2 \times 10^7$ 個/mlの播種濃度の場合と比較して減少していた。また、 $2 \times 10^5$ 個/ml及び $4 \times 10^5$ 個/mlではコンドロイチン硫酸の産生も不十分であった。

【0047】これらの結果から、コラーゲン濃度を1.5重量%とし、 $2 \times 10^5$ 個/mlから $2 \times 10^7$ 個/mlの播種密度とすることによって、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生を優先に行っていることが確認できた。この時、殆どの細胞が軟骨細胞形態を維持しており、コンドロイチン硫酸の産生が効率よく行われ、生体親和性の高い軟骨移植用材料を提供することができる。 $4 \times 10^6$ 個/mlから $2 \times 10^7$ 個/mlの播種密度では、さらに効率よくコンドロイチン硫酸の産生が行われ、より効率的な軟骨移植用材料を提供できることが示された。

【0048】<実施例2> 実施例1と同様に日本白色家兎の関節軟骨を採取し、酵素処理により軟骨細胞を分離した後、軟骨細胞浮遊液を作製した。この軟骨細胞浮遊液を1:4の割合でコラーゲン（アテロコラーゲン：高研社製）内に $2 \times 10^4$ 個/ml、 $2 \times 10^5$ 個/ml、 $2 \times 10^6$ 個/ml、 $2 \times 10^7$ 個/mlの各密度になるように包埋した後、100μlごとの担体としてディッシュに播種し、培養を開始した。このときコラーゲンの最終濃度は、2.4重量%であった。培地には、50μg/ml

アスコルビン酸及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ヒアルロン酸を含むように調製した $10\text{v}/\text{v}\%$ FBS（ウシ胎児血清）-DMEM（ダルベッコ変法イーグル最小必須培地）を使用し、 $5\%\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$ の培養条件下で、適宜培地交換を行いながら5週間培養し、1週間毎に細胞数の推移を観察した。細胞数の増減のグラフを図1に示す。図1における細胞数は一担体（ $100\mu\text{l}$ ）あたりの細胞数（cells/well）を示しているため、播種密度に対して $1/10$ の値となっている。

【0049】組織学的変化、殊に細胞の形態に関しては、28日間（4週間）培養した時点でのコラーゲングルを切断し、その断面像を顕微鏡により観察した。図2として $2\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ 及び $2\times 10^4$ 個/ $\text{ml}$ の播種密度で培養したときの顕微鏡写真を示す。

【0050】図1に示されるように、播種密度が低いほど増殖の速度が早く、細胞が比較的活発に増殖していたが、播種密度が高いと細胞数の大幅な増加は認められなかった。形態変化に関しては、 $2\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ では多くの細胞で、円形である軟骨細胞の形態が維持されており、線維芽様細胞の細胞形態に変化していなかった

（図2（a）参照）。また、図示していないが、軟骨基質も十分に産生されており、軟骨移植用材料として適した量であった。

【0051】これに対して、 $2\times 10^4$ 個/ $\text{ml}$ では、殆どの細胞において線維芽様細胞への形態変化が観察され（全体の細胞の対する線維芽様細胞の割合は略80%）、若干の軟骨基質の産生が見られるものの、軟骨移植用材料としては十分な量とは言い難いものであった（図2（b）参照）。一方、図示していないが、 $2\times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ 及び $2\times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ では、 $2\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ と同様に多くの細胞が軟骨細胞の形態を維持しており、基質も十分に産生されていた。

【0052】これらの結果から、コラーゲン濃度を2.4重量%とし、 $2\times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ から $2\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ の播種密度とすることによって、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生が優先的に行われていることが確認できた。この時、殆どの細胞が軟骨細胞形態を維持しており、軟骨基質の産生が効率よく行われ、生体親和性の高

い軟骨移植用材料を提供することができる。

【0053】（2）ブタタイプIコラーゲングルでの培養

実施例1と同様にして、軟骨細胞を分離し、タイプIコラーゲングルでの培養を行った。コラーゲングルは、0.3%ブタタイプIコラーゲン溶液（酸性溶解物、新田ゼラチン社製）を、 $\text{pH}7.0$ に調整して調製した。コラーゲン溶液は、 $1\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ の播種密度となるように細胞含有培養液と混合し、 $37^\circ\text{C}$ で静置して、ゲル化させて培養を開始した。コラーゲングルの最終濃度は0.21重量%であった。4週間の包埋培養後に、前記同様に細胞数を計測し、組織観察を行い、軟骨基質の産生を確認するため、酸性ムコ多糖類の検出方法であるアルシアンブルー染色を常法により行った。

【0054】その結果、細胞数は約1.5倍に増殖した程度であったが、軟骨細胞様形態を維持しており、線維芽様細胞の細胞は認められなかった。また、多量の酸性ムコ多糖類が認められた。これにより、 $1\times 10^7$ 個/ $\text{ml}$ の細胞播種密度では、ブタタイプIコラーゲングルにおいても、細胞の増殖よりも軟骨基質の産生が優先的に行われることが示された。このような適度な軟骨基質を含有するコラーゲングルでは、軟骨移植用として移植した後も、生体との親和性に優れ、効率よく軟骨の修復ができる。

【0055】

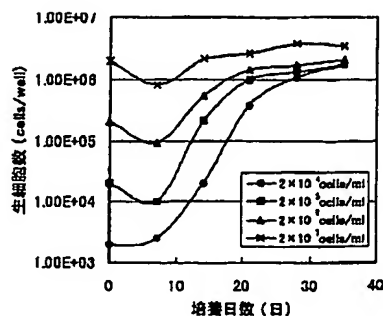
【発明の効果】本発明によれば、生体との親和性が高く移植後に軟骨組織を効率よく再建可能な軟骨細胞移植材料及びその製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例に係る軟骨移植用材料におけるコラーゲングル中での軟骨細胞の細胞数の増減を示すグラフである。

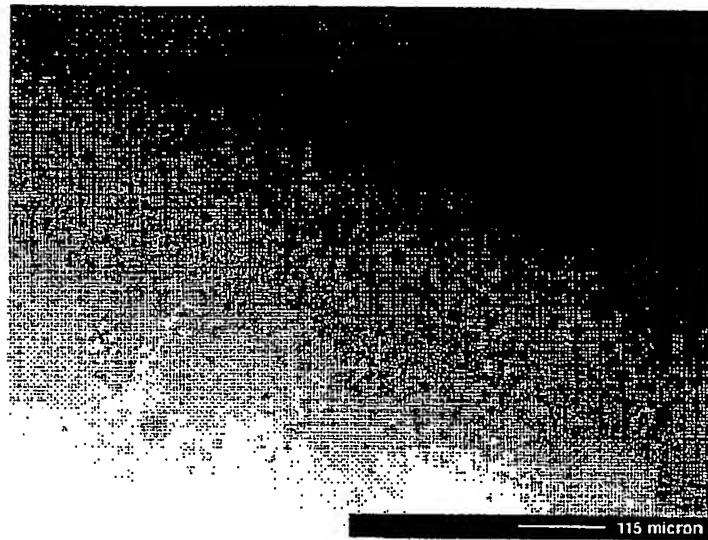
【図2】（a）は本発明の実施例に係る軟骨移植用材料において、軟骨細胞形態が維持されていることを示す図、（b）は本発明の比較例に相当する軟骨移植用材料において、軟骨細胞の形態が変化したことを示す図である。

【図1】

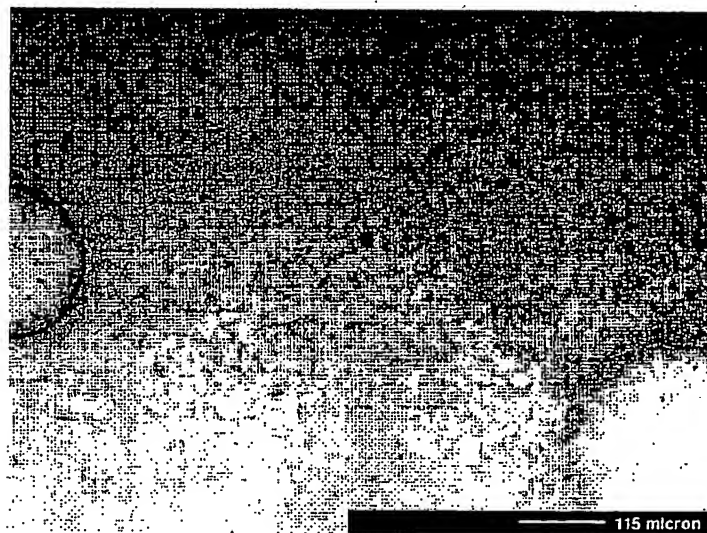


【図2】

(a)



(b)



---

フロントページの続き

(72)発明者 河▲崎▼ 賢三

島根県出雲市小山町2 401号

(72)発明者 勝部 顕一

島根県出雲市塩冶町838 A-5号室

(72)発明者 加藤 雅一

愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジ  
ニアリング内

BEST AVAILABLE COPY

(72)発明者 山本 剛之

愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング内

(72)発明者 福島 里佳

愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング内